

45
DJ
81-10-81

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

PATENT

In re application of: **Hiroyuki FUJITA**

Serial No.: **Not Yet Assigned**

Filed: **September 18, 2000**

For: **ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITOR**



CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119

Director of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

September 18, 2000

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application is hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

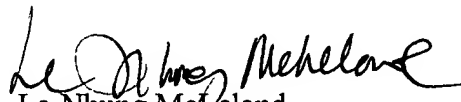
Japanese Appln. No. 11-293113, filed on October 15, 1999

In support of this claim, the requisite certified copy of said original foreign application is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicant has complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said certified copy.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge our Deposit Account No. 01-2340.

Respectfully submitted,
ARMSTRONG, WESTERMAN, HATTORI
McLELAND & NAUGHTON


Le-Nhung McLeland
Reg. No. 31,541

Atty. Docket No.: 001200
Suite 1000, 1725 K Street, N.W.
Washington, D.C. 20006
Tel: (202) 659-2930
Fax: (202) 887-0357
LNM/yap

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1 9 9 9 年 1 0 月 1 5 日

出 願 番 号

Application Number:

平成 1 1 年 特 許 願 第 2 9 3 1 1 3 号

出 願 人

Applicant (s):

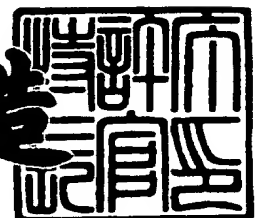
日本合成化学工業株式会社



2 0 0 0 年 8 月 2 5 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 0 - 3 0 6 7 6 0 6

【書類名】 特許願

【整理番号】 P00099-128

【提出日】 平成11年10月15日

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【国際特許分類】 C07K 7/14

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市室山 2 丁目 1 3 番 1 号 日本合成化学工業株式会社 中央研究所内

【氏名】 藤田 裕之

【特許出願人】

【識別番号】 000004101

【氏名又は名称】 日本合成化学工業株式会社

【代表者】 下坂 雅俊

【電話番号】 0726(43)2207

【連絡先】 日本合成化学工業株式会社 中央研究所 知的財産グループ内

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 061012

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アンギオテンシン変換酵素阻害剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 魚肉をサーモリシン酵素で分解して得られるペプチド含有組成物であり、かつ分子量が5000以上のポリペプチド成分の含有量を10重量%以下としたことを特徴とするアンギオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項2】 ペプチド含有組成物が下記のオリゴペプチドの少なくとも1種を含むことを特徴とする請求項1記載のアンギオテンシン変換酵素阻害剤。

I l e - T y r、

P h e - G l n - P r o、

I l e - L e u - T y r、

I l e - T y r - A l a、

I l e - L y s - T r p、

L e u - L y s - T y r - P r o、

I l e - V a l - A r g - A s p、

L e u - L y s - P r o - A s n - M e t、

I l e - T r p - H i s - H i s - T h r、

A l a - L e u - P r o - H i s - A l a、

I l e - L y s - P r o - L e u - A s n - T y r、

A s p - T y r - G l y - L e u - T y r - P r o、

I l e - V a l - G l y - A r g - P r o - A r g - H i s - G l n - G l y

【請求項3】 魚肉が魚節である請求項1あるいは2記載のアンギオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項4】 魚肉が魚節の熱水抽出残渣である請求項1あるいは2記載のアンギオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項5】 魚節がかつお節である請求項3あるいは4記載のアンギオテンシン変換酵素阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、医薬品、食品、健康食品、特定保健用食品などに使用することができる魚肉をサーモリシン酵素で分解して得られるペプチド含有組成物よりなるアンギオテンシン変換酵素阻害剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

アンギオテンシン変換酵素は、主として肺や血管内皮細胞、腎近位尿細管に存在し、アンギオテンシン I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) に作用して、アンギオテンシン I の C 末端よりジペプチド (His-Leu) を開裂遊離させ、強力な昇圧作用を有するアンギオテンシン II を生成させる酵素である。また、この酵素は生体内降圧物質であるブラジキニンを破壊し不活化する作用も併有し、昇圧系に強力に関与している。従来より、アンギオテンシン変換酵素の活性を阻害すれば、降圧に働き、臨床的には高血圧症の予防、治療に有効であると考えられている。

【0003】

最近ではプロリン誘導体であるカプトプリルが合成され、降圧活性が確認されて以来、種々のアンギオテンシン変換酵素阻害物質の合成研究が盛んであり、又天然物からの取得も試みられているところである。

天然物由来のアンギオテンシン変換酵素阻害剤は食品あるいは食品原料から得られるので低毒性で安全性の高い降圧剤となることが期待されるからである。

本出願人も先に、特開平 4-69397 号公報で Leu-Lys-Pro 骨格をもつ新規ペプチドを開示した。また、特開平 4-144696 号公報で蛋白質をサーモライシン（サーモリシン）で加水分解するアンギオテンシン変換酵素阻害剤含有組成物の製造方法を開示し、更に特開平 5-244979 号公報では、肉類を 50℃ 以上の水中で加熱処理し、水不溶性蛋白質を抽出除去して得られる水不溶性の蛋白質を主体とする残渣をプロテアーゼで加水分解するアンギオテンシン変換酵素阻害剤含有組成物の製造方法を開示した。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記特開平 4 - 6 9 3 9 7 号公報に開示の新規ペプチドの阻害活性は非常に強いものではあるが、実用的に該ペプチドのみを単離するには非常に労力を要し、コストアップとなる。また、特開平 4 - 1 4 4 6 9 6 号公報や特開平 5 - 2 4 4 9 7 9 号公報に開示の製造方法では、ある程度阻害活性の強い組成物が得られるものの、該組成物を摂取して効果を得るための摂取量がやや多く、毎日手軽に摂取するためには更に摂取量を低減することが望まれ、更に上記組成物は蛋白質としてかつお節を用いた場合、ペプチド特有の苦みは少ないものの、後味の点で更に改良の余地があった。

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、かかる課題を解決すべく鋭意検討した結果、魚肉をサーモリシン酵素で分解して得られるペプチド含有組成物であり、かつ分子量が 5 0 0 0 以上のポリペプチド成分の含有量を 1 0 重量%以下としたアンギオテンシン変換酵素阻害剤（以下阻害剤と称する）が強い阻害活性を示し、色相もよく、苦みが全くなく、後味がさっぱりして、摂取し易いことを見だし本発明を完成した。

【 0 0 0 6 】

【発明の詳細な説明】

以下に本発明を詳細に述べる。

本発明におけるペプチド含有組成物は、魚肉をサーモリシン酵素で分解して得られるもので、かかる魚肉としては、かつお、さば、いわし、たら、さけ、さんま、はまち、あじ等の生身、及びこれらの乾燥物、これらを熱水抽出した残渣、これらの魚節（熱水抽出残渣を乾燥し必要に応じて佃付けしたもの）、更にはかかる魚節の熱水抽出残渣等が挙げられ、好ましくは魚節の熱水抽出残渣が用いられる。また、該魚節の中では、かつお節が好ましい。

また、分解酵素として用いられるサーモリシン酵素は精製品でも、多少の他の酵素が混合されている粗酵素液でもよく、市販品の『サモアーゼ』（大和化成社製）を用いてもよい。

【 0 0 0 7 】

魚肉をサーモリシン酵素で分解するに当っては、魚肉に水とサーモリシン酵素

を加えて、加水分解を実施する。該加水分解を行うにあたっては、魚肉の性状により前処理をおこなってもよく、その場合魚肉に水あるいは熱水を加えて混合し強力な攪拌でホモジナイズする。加水分解を行う際のサーモリシン酵素の添加量は、魚肉と水の合計量に対して、0.05～5.0重量%が好ましく、更には0.1～1.0重量%である。添加量が0.05重量%未満では、加水分解が十分進行せず、また、5.0重量%を越えても、サーモリシン酵素を浪費するだけで好ましくない。

【0008】

加水分解時の反応温度は10～85℃が好ましく、更には40～80℃である。反応温度が10℃未満では、加水分解が十分進行せず、85℃を越えると、サーモリシン酵素の失活が激しくなり好ましくない。

加水分解時のpHは6～8が好ましい。pHが6未満あるいは8を越えると、加水分解率が低くなり好ましくない。加水分解反応開始前の液は通常pHが4～5.5であるので、アルカリ水溶液（例えば水酸化ナトリウム水溶液）でpHを6～8程度に調整するのが好ましい。

反応時間は10分～30時間が好ましく、更には3～20時間である。反応時間が10分未満では、分解物の収率が悪く、30時間を越えると生産効率が悪くなり好ましくない。

【0009】

加水分解率は特に制限はされないが、最終の加水分解率が10～60%となるように調整するのが好ましく、更には20～50%である。該分解率が10%未満のときは、得られるペプチドが少なく生産効率が悪く、60%を越えるためには、長時間の加水分解が必要で、更にサーモリシン酵素が多量に必要なになるので好ましくない。なお該分解率は、Journal of Agricultural and Food Chemistry、第24巻、第6号、第1090～1093頁（1976）に基づいて測定することができる。

【0010】

本発明では上記酵素で分解して得られたペプチド含有組成物中に含まれる分子量5000以上のポリペプチド成分の含有量を、該組成物の固形分に対して10

重量%以下とすることを最大の特徴とし、具体的には分子量5000以上のポリペプチド成分を15～30重量%程度含む上記分解物から、分子量5000以上のポリペプチド成分を含有量が10重量%以下、好ましくは0.1～5重量%になるまで取り除く。分子量5000以上のポリペプチド成分の含有量が10重量%を越えると、色相が黄色～褐色となり、苦みが少し残存し、味がさっぱりとせず、味の薄いものに添加すると後味がいつまでも残存するという欠点があり、更に阻害活性の向上も見られず不適當である。

【0011】

なお、本発明での分子量は試料をゲル濾過クロマトグラフィーにより測定する。具体的には分子量既知のペプチド、蛋白質〔Asp-Gly-Leu-Tyr-Pro（分子量563）、ニューロテンシン（分子量1637）、リボヌクレアーゼ（分子量13700）〕を標準物質として、以下の条件で抽出物を溶出させて、溶出時間を測定し、対数グラフの縦軸に分子量、横軸に溶出時間をプロットした検量線に基づいて分子量を求める。また、本発明では、分子量5000以上のポリペプチド成分の重量%は得られた溶出チャートの分子量5000の位置でピークを分割し、5000以上のポリペプチド成分に相当するピーク面積の面積%で求めることとする。

【0012】

（分画条件）

カラム : Protein Pak 60 (Waters 社製)

5×250mm

移動相 : 0.1容量% TFA (トリフルオロ酢酸) 含有 50容量% アセトニトリル水溶液

流速 : 0.7 mL/min

検出器 : RI

サンプル量 : 1mg

【0013】

（標準物質の分子量と溶出時間の関係）

標準物質	分子量	溶出時間 (分)
------	-----	----------

Asp-Gly-Leu-Tyr-Pro	563	31
ニューロテンシン	1637	26
リボヌクレアーゼ	13700	19

上記条件では分子量5000の物質は29分に溶出されるので、本発明では29分以前に溶出する物質を分子量5000以上のポリペプチド成分とする。

【0014】

分子量5000以上のポリペプチド成分を取り除く方法としては、①ゲル濾過クロマトグラフィーにより、分子量5000以上の画分を取除く方法、②膜処理により、分子量5000以上の画分を除く方法、③該抽出物をメタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、クロロホルム、酢酸エチル、トルエン、ヘキサン、ベンゼンなどの極性有機溶媒を用いた溶媒分画法で高分子画分を取除く方法等を単独あるいは適宜組合わせて実施する。

かかる①～③の方法について簡単に説明する。

【0015】

①の方法は前記分子量の分析法として述べた方法を工業的なスケールで実施する方法である。

②の方法は、分解液を分画分子量が5000程度の膜（UF膜）、例えばミリポア社製UF膜「PLCC（分画分子量5000）」、アドバンスドメンブランテクノロジー社製UF膜「AES-5（分画分子量5000）」、アブコ社製UF膜「HFK-131（分画分子量5000）」、旭化成社製UF膜「SEP1013（分画分子量3000）」を通過させて、通過画分を分取して実施する方法である。

③の方法は、分解液を析出物が出ない程度に濃縮して、そこに5～100倍程度の有機溶剤を添加して、系内の有機溶剤の濃度を60～99容量%とすることにより、高分子物質を沈殿させる方法である。

【0016】

かくして得られた阻害剤は、各種のオリゴペプチドや若干の核酸、部分分解した蛋白質等の混合物であり、該オリゴペプチドとして、具体的には下記のペプチドの少なくとも1種が含まれる。

Ile-Tyr、
 Phe-Gln-Pro、
 Ile-Leu-Tyr、
 Ile-Tyr-Ala、
 Ile-Lys-Trp、
 Leu-Lys-Tyr-Pro、
 Ile-Val-Arg-Asp
 Leu-Lys-Pro-Asn-Met、
 Ile-Trp-His-His-Thr、
 Ala-Leu-Pro-His-Ala、
 Ile-Lys-Pro-Leu-Asn-Tyr、
 Asp-Tyr-Gly-Leu-Tyr-Pro、
 Ile-Val-Gly-Arg-Pro-Arg-His-Gln-Gly
 【0017】

上記でいう Leu はロイシン、Lys はリジン、Pro はプロリン、Asn はアスパラギン、Met はメチオニン、Ile はイソロイシン、Trp はトリプトファン、Phe はフェニルアラニン、Gln はグルタミン、Tyr はチロシン、Gly はグリシン、His はヒスチジン、Thr はスレオニン、Ala はアラニン、Val はバリン、Arg はアルギニン、Asp はアスパラギン酸を意味し、かかるアミノ酸はいずれも L-体である。

【0018】

本発明の阻害剤は加水分解して得られた分解液を上記のような組成に調整した水溶液や水を取り除いて粉末としたものである。水を取り除く際の脱水手段としては、濃縮乾固、フリーズドライ、スプレードライ、真空乾燥等の方法が用いられる。本発明の阻害剤は製剤にして、医薬品、健康食品（健康補助食品）として用いられ、そのまま食品に添加して用いられる。

【0019】

製剤して医薬品として用いられる場合、阻害剤は単独あるいは製剤用担体と混合して調製した製剤の形で使用される。製剤用担体としては、製剤分野において

常用され、かつ本発明の阻害剤と反応しない物質が用いられる。具体的には、例えば乳糖、ブドウ糖、マンニット、デキストリン、シクロデキストリン、デンプン、蔗糖、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、合成ケイ酸アルミニウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルデンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、イオン交換樹脂、メチルセルロース、ゼラチン、アラビアゴム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、軽質無水ケイ酸、ステアリン酸マグネシウム、タルク、トラガント、ベントナイト、ビーガム、酸化チタン、ソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウム、グリセリン、脂肪酸グリセリンエステル、精製ラノリン、グリセロゼラチン、ポリソルベート、マクロゴール、植物油、ロウ、流動パラフィン、白色ワセリン、フルオロカーボン、非イオン界面活性剤、プロピレングリコール、水等が挙げられる。

【0020】

剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸濁剤、注射剤等が挙げられる。これらの製剤は常法に従って調製される。

上記で製剤された医薬品や健康食品は、血圧降下、心筋肥大防止、脳卒中防止の目的で用いられる。

【0021】

また、本発明の阻害剤は苦みがなく後味もよいので農水産加工品、乳製品、菓子、調味料、飲料、フリーズドライ食品、レトルト食品等の食品や健康食品や健康補助食品、食品添加物用途に使用される。食品としては、特に制限はされないが、具体的に対象となる食品としては、以下のものが挙げられる。

(1) 農水産加工品

はるさめ、こしあん、こんにやく、パン、麺類（即席めん、パスタ、生めん、乾めん）、餅、シリアル食品、大豆加工品（豆腐、豆乳、納豆、凍豆腐）、水産加工品〔練り製品、（かに風味）蒲鉾、（魚肉）ハム、（魚肉）ソーセージ、（魚肉）ウィンナー、ふりかけ、お茶づけのり〕、缶詰（シーチキン、オイルサーディン、焼鳥）、レトルト食品（カレー、シチュー、スパゲティー）

【0022】

(2) 乳製品

牛乳、加工乳、乳酸菌飲料、バター、チーズ、練乳、粉乳

(3) 菓子

ケーキ、ムース、(粉末)デザート、アイスクリーム、飴、チョコレート、グミ、キャンディー、クッキー、ウエハース、ゼリー

(4) 調味料

味噌、醤油、うま味(風味)調味料、(粉末)天然調味料、ソース、ドレッシング、焼き肉のたれ、みりん、カレー、シチュー、香辛料、スパイス、ヨーグルト

(5) 飲料

清涼飲料(炭酸飲料、果実飲料、スポーツドリンク、栄養飲料)、嗜好飲料(コーヒー、ココア、麦汁)、みそ汁、スープ

【0023】

(6) 健康食品

イ) サポニン含有食品(オタネニンジン根含有食品、エソウコギ含有食品)

ロ) 糖含有食品〔オリゴ糖(フラクトオリゴ糖含有食品、イソマルトオリゴ糖含有食品、ガラクトオリゴ糖含有食品)、多糖類(シイタケ含有食品、ムコ多糖、蛋白含有食品、コンドロイチン硫酸含有食品、マンネンタケ(靈芝)含有食品、キチン、キトサン含有食品〕

ハ) ミネラル含有食品(カルシウム含有食品、アルファルファ含有食品、ブルーネエキス食品、 β -カロチン含有食品)

ニ) 油脂含有食品

ビタミンE含有油脂〔麦(小麦、鳩麦)胚芽油、大豆胚芽油、米胚芽油〕エイコサペンタエン酸含有食品、大豆レシチン含有食品、 γ -リノレン酸含有食品(月見草油、ボラージ油)、ドコサヘキサエン酸含有食品

ホ) 蛋白質含有食品

大豆蛋白含有食品、カゼイン、ホエー蛋白、鰹加工食品

ヘ) タウリン

牡加工食品、シジミ加工食品、緑イ貝加工食品

(7) その他

スッポン加工食品、アミノ酸代謝異常用食品、流動食（病食）

【0024】

本発明の阻害剤の投与量（摂取量）は、投与方法、患者の症状、年令等により異なるが、通常1回0.001～3000mg、好ましくは0.01～1000mgを1日当たり1～3回である。これらの製剤あるいは食品は、本発明の阻害剤を0.01重量%以上、好ましくは0.5～80重量%の割合で含有することができる。これらの製剤あるいは食品は、治療上価値ある他の成分を含有していてもよい。

【0025】

【実施例】

以下本発明について具体的に説明する。尚、以下の記述で「部」、「%」とあるのはそれぞれ「重量部」、「重量%」を意味する。

実施例1

かつお節120部に水1000部を加えて、90℃で1時間熱水抽出した後、ざるで濾過して得られた残渣500部（固形分20%）に、サーモリシン酵素5部、水900部を加えて、1%水酸化ナトリウム水溶液でpHを7.5とし、60℃で15時間、分解率40%まで加水分解し、濾過後、濃縮液100部（E-1）〔固形分40%〕を得た。

該濃縮液を下記の条件で膜処理して、膜濃縮画分（E-2）50部〔固形分40%〕を取除いて、膜通過画分（E-3）50部〔固形分40%〕を得た。

【0026】

（膜処理条件）

装置 : クロスフローUF膜試験機（ミリポア社製）

膜 : SEP1013（分画分子量3000、旭化成社製）

加圧条件 : 窒素ガスにより1.5kg/cm²に加圧

線速度 : 1m/sec

【0027】

上記膜通過画分 (E-3) には、Ile-Tyr、Phe-Gln-Pro、Ile-Leu-Tyr、Ile-Tyr-Ala、Ile-Lys-Trp、Leu-Lys-Tyr-Pro、Ile-Val-Arg-Asp、Leu-Lys-Pro-Asn-Met、Ile-Trp-His-His-Thr、Ala-Leu-Pro-His-Ala、Ile-Lys-Pro-Leu-Asn-Tyr、Asp-Tyr-Gly-Leu-Tyr-Proなるオリゴペプチドがいずれも確認された。確認法としては、まず上記オリゴペプチドを少量ペプチド合成し、標品とした。次にHPLCで、逆相カラムにより、その標品と同じ保持時間の画分を分取した。この操作を3回繰り返して最後に同じ保持時間のピークをプロテインシーケンサーによりペプチド配列を決定した。

本発明の方法で分子量5000以上のポリペプチド成分を測定したところ含有量は3%であった。

【0028】

それぞれの画分 (E-1、E-2、E-3) のアンギオテンシン変換酵素阻害活性を以下のように測定した。

(アンギオテンシン変換酵素阻害活性の測定)

アンギオテンシン変換酵素阻害活性の測定は、CheungとCushmanの方法[Biochemical Pharmacology 20, 1637 (1971)] に準じて以下の方法で行った。

酵素基質; Bz (ベンジル) -Gly-His-Leu

(86mgを水8mlとリン酸緩衝液8mlに溶解した溶液)

酵 素 ; うさぎの肺のアセトンパウダー (シグマ社製)

(1gを50mMのリン酸緩衝液10ml中で粉碎した後、遠心分離した上澄液)

【0029】

上記の酵素基質を100 μ l、酵素溶液を12 μ l及び本発明の所定濃度のペプチドを混合し、水で全体を250 μ lとした後、37℃で30分間反応を行った。

反応は1N-HCl 250 μ lを用いて終了させた。反応終了液に酢酸エチ

ル 1. 5 ml を入れ V o r t e x で 15 秒 攪拌 し、それを遠心分離した。
酢酸エチル層から 1. 0 ml を取り出して、酢酸エチルを留去し、それに 1 ml
の蒸留水を入れて残渣を溶解し、抽出された馬尿酸の紫外吸収 228 nm の値 (OD_{228}) を測定した。

阻害率は阻害剤なしで反応したときの OD_{228} を 100 % とし、反応時間 0 分
のときの OD_{228} を 0 % とし、求め阻害率 50 % の時の阻害剤の濃度 IC_{50} (μ
g / ml) で表示した。

【 0030 】

更に得られた阻害剤について以下の濃縮乾固時の色相、1 % 水溶液の苦みと風味
の評価を以下のように行った。

(色相)

- ◎・・・純白色である。
- ・・・ほとんど白色である。
- △・・・やや黄色である。
- ×・・・黄色である。

(苦み)

- ◎・・・苦みがまったくしない。
- ・・・苦みが少しする。
- △・・・苦みがする。
- ×・・・苦みをかなり感じる。

【 0031 】

(風味)

- ◎・・・後味が全く無く、さっぱりとした味である。
- ・・・後味がほとんど残らない。
- △・・・後味が残るもののそれほど違和感はない。
- ×・・・違和感のある後味が残る。

【 0032 】

【表 1】

分画成分	収量*	IC_{50}	色相	苦み	風味
------	-----	-----------	----	----	----

	(%)	($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
E-1	33.3	80	Δ	Δ	\times
E-2	16.7	300	Δ	\times	\times
E-3	16.7	30	\odot	\odot	\odot

*それぞれの分画成分を濃縮乾固して重量を求め、原料（かつお節）の重量に対する値とした。

尚E-1中の分子量5000以上のポリペプチド成分の含有量は20%であった。

【0033】

実施例2

実施例1で得られた濃縮液（E-1）100部〔固形分40%〕に、エタノールを95容量%となるように添加して室温で一晩放置して、析出した画分（E-4）85部〔固形分40%〕を濾過して取除き、濾液からエタノールを減圧留去して、画分（E-5）15部〔固形分40%〕を得た。該画分（E-5）中には実施例1で確認されたオリゴペプチドを全て含んでいた。該画分（E-5）の分子量5000以上のポリペプチド成分の含有量は5%であった。

実施例1と同様に阻害活性を測定し、色相、苦み、風味を評価し表2に示した。

【0034】

【表2】

分画成分	収量* (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	色相	苦み	風味
E-1	33.3	80	Δ	Δ	\times
E-4	28.3	200	\times	Δ	\times
E-5	5.0	40	\bigcirc	\odot	\odot

*それぞれの分画成分を濃縮乾固して重量を求め、原料（かつお節）の重量に対する値とした。

【0035】

実施例3

実施例 1 において、かつお節 1 2 0 部に水 1 0 0 0 部を加えて、ホモジナイズしたものにサーモリシン酵素 5 部を加えて実施例 1 と同様に加水分解を行い、濃縮液 (E-6) 1 0 0 部〔固形分 4 5 %〕を得た。

該濃縮液を実施例 1 と同じ条件で膜処理して、膜濃縮画分 (E-7) 5 0 部〔固形分 4 5 %〕を取除いて、膜通過画分 (E-8) 5 0 部〔固形分 4 5 %〕を得た。

該画分 (E-8) 中には実施例 1 で確認されたオリゴペプチドを全て含んでいた。該画分 (E-8) の分子量 5 0 0 0 以上のポリペプチド成分の含有量は 4 % であった。

実施例 1 と同様に阻害活性を測定し、色相、苦み、風味を評価し表 3 に示した。

【0 0 3 6】

【表 3】

分画成分	収量* (%)	I C ₅₀ (μ g/ml)	色相	苦み	風味
E-6	3 7. 5	1 1 0	×	×	×
E-7	1 8. 8	3 1 0	△	×	×
E-8	1 8. 8	3 5	◎	◎	◎

*それぞれの分画成分を濃縮乾固して重量を求め、原料 (かつお節) の重量に対する値とした。

尚 E-6 中の分子量 5 0 0 0 以上のポリペプチド成分の含有量は 2 5 % であった。

【0 0 3 7】

実施例 4

実施例 3 において得られた濃縮液 (E-6) 1 0 0 部〔固形分 4 5 %〕にエタノールを 9 5 容量%となるように添加して室温で一晩放置して、析出した画分 (E-9) 8 0 部〔固形分 4 5 %〕を濾過して取除き、濾液からエタノールを減圧留去して、画分 (E-10) 2 0 部〔固形分 4 5 %〕部を得た。該画分 (E-10) 中には実施例 1 で確認されたオリゴペプチドを全て含んでいた。該画分 (E

-10) の分子量 5000 以上のポリペプチド成分の含有量は 2% であった。

実施例 1 と同様に阻害活性を測定し、色相、苦み、風味を評価し表 4 に示した。

【0038】

【表 4】

分画成分	収量* (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	色相	苦み	風味
E-6	37.5	110	×	×	×
E-9	30.0	200	△	×	×
E-10	7.0	50	◎	◎	◎

*それぞれの分画成分を濃縮乾固して重量を求め、原料（かつお節）の重量に対する値とした。

【0039】

【発明の効果】

本発明の阻害剤は、魚肉をサーモリシン酵素で分解して得られるペプチド含有組成物であり、かつ分子量が 5000 以上のポリペプチド成分の含有量を 10 重量%以下としたので、強い阻害活性を示し、尚かつ色相が良く、苦みがなく後味もよいので摂取しやすい。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 色相がよく摂取しやすく、強いアンギオテンシン変換酵素阻害活性を示すアンギオテンシン変換酵素阻害剤を提供すること。

【解決手段】 魚肉をサーモリシン酵素で分解して得られるペプチド含有組成物であり、かつ分子量が5000以上のポリペプチド成分の含有量を10重量%以下としたアンギオテンシン変換酵素阻害剤。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004101]

1. 変更年月日 1997年 4月21日

[変更理由] 住所変更

住 所 大阪府大阪市北区大淀中一丁目1番88号 梅田スカイビル
タワーイースト

氏 名 日本合成化学工業株式会社